



Attorney's Docket No.: 12372-002001 #18

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Aki Kitagawa et al.

Art Unit : 1623

Serial No. : 09/834,103

Examiner : Patrick T. Lewis

Filed : April 12, 2001

Title : SUSTAINED RELEASE DRUG COMPOSITIONS

TECH CENTER 1600/2900

JUL 16 2003

RECEIVED

MAIL STOP RCE

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, VA 22313-1450

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENTS UNDER 35 USC §119

Responsive to Final Office Action dated January 8, 2003, Applicant hereby confirms his claim of priority under 35 USC §119 from the following application(s):

Japanese Application No. JP 2000-115091 filed April 17, 2000; and

Japanese Application No. JP 2000-203850 filed July 5, 2000

A certified copy of each application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: 7-8-03

Y. Rocky Tsao

Y. Rocky Tsao
Reg. No. 34,053

Fish & Richardson P.C.

225 Franklin Street

Boston, MA 02110-2804

Telephone: (617) 542-5070

Facsimile: (617) 542-8906

20686174.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

7-8-03

Date of Deposit

Cheryl A. Caron

Signature

CHERYL A. CARON

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 7月 5日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-203850

[ST.10/C]:

[JP2000-203850]

出 願 人

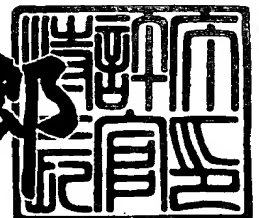
Applicant(s):

株式会社エルティーティー研究所

2003年 4月11日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3025836

【書類名】 特許願
 【整理番号】 P-1067
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 A61K 38/00

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区梅丘 1 - 1 1 - 1 1
 【氏名】 水島 裕

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区南生田 5 - 8 - 2
 【氏名】 五十嵐 理慧

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区太尾町 1 5 6
 東芝太尾アパート 1 - 1 1 6
 【氏名】 北川 晶

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区長沢 4 - 3 - 2
 【氏名】 高木 幸江

【特許出願人】

【識別番号】 391043055
 【氏名又は名称】 株式会社エルティーティー研究所

【代理人】

【識別番号】 100096758
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高橋 剛

【選任した代理人】

【識別番号】 100114845
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高橋 雅和

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-115091

【出願日】 平成12年 4月17日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003414

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 徐放製剤、その製造法及びワクチン

【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬効をもつ蛋白質溶液と酸性ムコ多糖体溶液を混和することにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤。

【請求項2】 薬効をもつ蛋白質溶液と酸性ムコ多糖体溶液を混和し、室温または1℃～5℃で溶液を酸性にすることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤。

【請求項3】 薬効をもつ蛋白質の少量を、薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液に溶解し、次に酸性ムコ多糖体溶液を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤。

【請求項4】 薬効をもつ蛋白質の少量を、薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液に溶解する時、結合性が弱い場合は、イオン強度及び／又は温度を下げたり、及び／又は結合強化剤を加え、次に酸性ムコ多糖体溶液を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤。

【請求項5】 薬効をもつ少量の蛋白あるいは蛋白結合性のある低分子薬剤を血漿蛋白質と結合するために両溶液を混合する時、結合性が弱い場合は、イオン強度及び／又は温度を下げたり、及び／又は結合強化剤を加え、次に酸性ムコ多糖体溶液を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤。

【請求項6】 薬効をもつ蛋白質又は蛋白結合性のある低分子薬剤をヒト血清蛋白質溶液に溶解し結合をはかる場合、結合性の弱い時は、共有結合させることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤。

【請求項7】 コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液と、ヒトγグロブリン溶液又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより生成される不溶性結合体を懸濁し、その懸濁液からなる徐放製剤。

【請求項8】 コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液の最終濃度が0.1%～2%であり、ヒトγグロブリン溶液の最終濃度が0.1%～2%であることを特徴とする請求項7記載の徐放製剤。

【請求項 9】 コンドロイチン硫酸ナトリウムに代えてヒアルロン酸ナトリウム又は人体に存在するすべての酸性ムコ多糖体を使用することを特徴とする請求項 7 記載の徐放製剤。

【請求項 10】 ヒトγグロブリンに代えてヒト血清アルブミン、ヒトフィブリノーゲン、ヒトヒストン、ヒトプロタミン、ゼラチン、コラーゲンを使用することを特徴とする請求項 7 記載の徐放製剤。

【請求項 11】 ワクチンの作用をもつ高分子物質を薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液に溶解し、次に酸性ムコ多糖体を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなるワクチン。

【請求項 12】 ワクチンの作用をもつ高分子物質を酸性ムコ多糖体溶液に混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなるワクチン。

【請求項 13】 コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液と、ヒトγグロブリン溶液又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH 6～pH 8 の緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、凍結乾燥することにより製造される徐放製剤の製造法。

【請求項 14】 コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液と、ヒトγグロブリン溶液又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH 6～pH 8 の緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、再度遠沈することにより製造される徐放製剤の製造法。

【請求項 15】 請求項 13 又は 14 記載の不溶性結合体を弱酸性緩衝液に小さな粒子となるよう再懸濁させることにより製造される徐放製剤の製造法。

【請求項 16】 コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液の最終濃度が 0.1%～2% であり、ヒトγグロブリン溶液の最終濃度が 0.1%～2% であることを特徴とする請求項 13 又は 14 記載の徐放製剤の製造法。

【請求項 17】 コンドロイチン硫酸ナトリウムに代えてヒアルロン酸ナトリウム又は人体に存在するすべての酸性ムコ多糖体を使用することを特徴とする

請求項 1 3 又は 1 4 記載の徐放製剤の製造法。

【請求項 1 8】 ヒトγグロブリンに代えてヒト血清アルブミン、ヒトフィブリノーゲン、ヒトヒストン、ヒトプロタミン、ゼラチン、コラーゲンを使用することを特徴とする請求項 1 3 又は 1 4 記載の徐放製剤の製造法。

【請求項 1 9】 請求項 1 3 記載の製造法により製造される徐放製剤。

【請求項 2 0】 請求項 1 4 記載の製造法により製造される徐放製剤。

【請求項 2 1】 請求項 1 5 記載の製造法により製造される徐放製剤。

【請求項 2 2】 請求項 1 6 記載の製造法により製造される徐放製剤。

【請求項 2 3】 請求項 1 7 記載の製造法により製造される徐放製剤。

【請求項 2 4】 請求項 1 8 記載の製造法により製造される徐放製剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、薬効をもつ蛋白質、多糖体及び蛋白結合性のある低分子薬剤のための、蛋白質と酸性ムコ多糖体の不溶性結合体からなる徐放製剤、ワクチン及び当該徐放製剤の製造法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

蛋白質（以下、本発明においては、ペプチドを含む）の薬剤は通常注射によらなければならない。また多くの蛋白薬剤の血中半減期は短いので、頻繁に注射しなければならない。また多糖体や低分子の薬剤の中でも注射療法の方が好ましいものがあり、この場合、徐放製剤が必要であり、またワクチンも徐放されることが好ましい。

【0 0 0 3】

以上の理由により、多くの蛋白薬剤などに応用できる優れた注射用の徐放製剤及びワクチンの開発が望まれている。これまでも高分子基材も含め薬剤の徐放製剤は種々検討されているが、蛋白質と多糖体不溶性結合体を用いたものはない。注射用徐放製剤としては PLGA 製剤、コラーゲンミニペレット、ポリエチレングリコール製剤などがあるが、技術的に通常複雑である。蛋白や金属との結合

物で徐放を得ているものがあるが、24時間以上持続するものはまれである。また、本発明に近いものとしては、現在開発中であるが、網目状のヒアルロン酸に蛋白質を封入したもの、プロタミン亜鉛インスリンのような結合物などがあるが、製造方法が複雑であることが多く、また一般的に特殊な薬剤にしか応用できていない。ワクチンについても同様な試みがなされているが優れたものがない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

そこで本発明は、製剤作製方法がきわめて簡単であり、ほとんどすべての蛋白薬剤に応用できるとともに、蛋白結合性のある多くの低分子薬剤についても利用可能で優れた徐放効果が得られる蛋白質と多糖体不溶性結合体からなる徐放製剤、ワクチン及び当該徐放製剤の製造法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、特に本発明者の一人である水島裕が酸性ムコ多糖体（グリコサミノグリカン）と蛋白質が酸性溶液中では不溶性結合体を作ること及び塩基性蛋白は中性溶液でも不溶性結合体を作ることとを膠原病の病変形成機序の研究として見出し、1962年にすでに報告している（最新医学、17(2)、483-487、1962）。しかしこの不溶性結合体を徐放製剤に利用するという研究及び発想は全くなかった。

そこで、本発明者らは最近この研究をすすめた結果、酸性溶液中で不溶化した蛋白質と酸性ムコ多糖体は中性溶液中では少しずつ溶解することを見出し、この現象をDDS（Drug Delivery System）に応用することができることを発見した。これらの知見に基づいて本発明を完成した。

【0006】

さらに、本発明におけるコンドロイチン硫酸ナトリウム溶液と、ヒトγグロブリン溶液又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH6～pH8の緩衝液又は弱酸性緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、再度遠沈することにより製造される徐放製剤は局所投与のみが可能であるが、本発明の他の

徐放製剤は通常全身投与を目的として、皮下あるいは筋肉内に注射するが局所投与も可能であり、かつワクチンは全身に抗体があがらないと効果がないので本発明のワクチンも基本的に全身投与を目的とするが、鼻、肺及び消化器官については局所投与が可能であることを発見した。

【0007】

そこで、1. 本発明の徐放製剤は、(1) 薬効をもつ蛋白質溶液と酸性ムコ多糖体溶液を混和することにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤、(2) 薬効をもつ蛋白質溶液と酸性ムコ多糖体溶液を混和し、室温または1℃～5℃で溶液を酸性にすることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤、(3) 薬効をもつ蛋白質の少量を、薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液に溶解し、次に酸性ムコ多糖体溶液を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤、(4) 薬効をもつ蛋白質の少量を、薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液に溶解する時、結合性が弱い場合は、イオン強度及び／又は温度を下げたり、及び／又は結合強化剤を加え、次に酸性ムコ多糖体溶液を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤、(5) 薬効をもつ少量の蛋白あるいは蛋白結合性のある低分子薬剤を血漿蛋白質と結合するために両溶液を混合する時、結合性が弱い場合は、イオン強度及び／又は温度を下げたり、及び／又は結合強化剤を加え、次に酸性ムコ多糖体溶液を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤、

(6) 薬効をもつ蛋白質又は蛋白結合性のある低分子薬剤をヒト血清蛋白質溶液に溶解し結合をはかる場合、結合性の弱い時は、共有結合させることにより生成される不溶性結合体からなる徐放製剤、(7) コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液とヒトγグロブリン溶液、又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより生成される不溶性結合体を懸濁し、その懸濁液からなる徐放製剤、(8) コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液の最終濃度が0.1%～2%であり、ヒトγグロブリン溶液の最終濃度が0.1%～2%である徐放製剤、(9) コンドロイチン硫酸ナトリウムに代えてヒアルロン酸ナトリウム又は人体に存在するすべての酸性ムコ多糖体を使用する徐放製剤、(10) ヒトγグロブリンに代えてヒト血清アルブミン、ヒトフィブリノーゲン、ヒトヒストン、ヒトプロ

タミン、ゼラチン、コラーゲンを使用する徐放製剤であり、2. 本発明のワクチンは、(1) ワクチンの作用をもつ高分子物質を薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液に溶解し、次に酸性ムコ多糖体を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなるワクチン、(2) ワクチンの作用をもつ高分子物質を酸性ムコ多糖体溶液に混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなるワクチンであり、3. 本発明の徐放製剤の製造法は、(1) コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液とヒトγグロブリン溶液、又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH 6～pH 8の緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、凍結乾燥することにより製造される徐放製剤の製造法、(2) コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液とヒトγグロブリン溶液、又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH 6～pH 8の緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、再度遠沈することにより製造される徐放製剤の製造法、(3) 前記(1)記載の不溶性結合体を弱酸性緩衝液に小さな粒子となるよう再懸濁させることにより製造される徐放製剤の製造法、(4) 前記(2)記載の不溶性結合体を弱酸性緩衝液に小さな粒子となるよう再懸濁させることにより製造される徐放製剤の製造法、(5) コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液の最終濃度が0.1%～2%であり、ヒトγグロブリン溶液の最終濃度が0.1%～2%である徐放製剤の製造法、(6) コンドロイチン硫酸ナトリウムに代えてヒアルロン酸ナトリウム又は人体に存在するすべての酸性ムコ多糖体を使用する徐放製剤の製造法、(7) ヒトγグロブリンに代えてヒト血清アルブミン、ヒトフィブリノーゲン、ヒトヒストン、ヒトプロタミン、ゼラチン、コラーゲンを使用する徐放製剤の製造法であり、さらに、4. 本発明の徐放製剤は、(1) コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液とヒトγグロブリン溶液又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH 6～pH 8の緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、凍結乾燥することにより製造される徐放製剤、(2) コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液とヒトγグロブリン溶液、又は低分子薬剤を含むグロブリン

溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH 6～pH 8の緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、再度遠沈することにより製造される徐放製剤、(3)前記(1)記載の不溶性結合体を弱酸性緩衝液に小さな粒子となるよう再懸濁させることにより製造される徐放製剤、(4)前記(2)記載の不溶性結合体を弱酸性緩衝液に小さな粒子となるよう再懸濁させることにより製造される徐放製剤、(5)コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液の最終濃度が0.1%～2%であり、ヒトγグロブリン溶液の最終濃度が0.1%～2%である徐放製剤、(6)コンドロイチン硫酸ナトリウムに代えてヒアルロン酸ナトリウム又は人体に存在するすべての酸性ムコ多糖体を使用する徐放製剤、(7)ヒトγグロブリンに代えてヒト血清アルブミン、ヒトフィブリノーゲン、ヒトヒストン、ヒトプロタミン、ゼラチン、コラーゲンを使用する徐放製剤である。

【0008】

本発明において、溶液を酸性とすることにより、蛋白質と酸性ムコ多糖体のイオン結合等が起りやすくなり、沈殿物が生じやすくなる。

又薬効をもつ蛋白質溶液と酸性ムコ多糖体溶液を混和し、溶液を酸性にする場合、室温または5℃以下、好適には1℃～5℃で溶液を酸性にすることが良い。

【0009】

室温においては、反応性が高まり、強固な結合体が出来るものであり、1℃～5℃においては、溶解度が下がるので不溶性結合体が出来やすく蛋白質が変性しにくいものである。

【0010】

少量の蛋白質のみでは十分多糖体と沈殿物を作るほど結合しないことがある。しかし安全性の確認されている薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液を加えることにより十分な沈殿物を作ることが出来る。この場合イオン強度及び／又は温度を下げるのが有利である場合があり、同時に／又はZnやCaなどの結合強化剤を用いるのが良い場合がある。

【0011】

低分子薬剤を本発明における不溶性結合体に入れるためには結合性の強い蛋白

質と低分子薬剤を結合させたあと酸性ムコ多糖体を混ぜると良いので、本発明においては、蛋白質結合性のある低分子薬剤を使用するが、結合性が弱い場合は、イオン強度及び／又は温度を下げたり、同時に／又はZnやCaなどの結合強化剤を加えると有利である。結合強化剤は、Zn、Ca、Co、Cu、Feなどの金属、パモ酸、プルロニックなどの界面活性剤、ポリエチレングルコールなどが好適である。

【0012】

イオン強度を下げると一般的に蛋白質が結合しやすく、温度を下げると、前述した1℃～5℃と同様に、溶解度が下がるので結合体が出来やすく蛋白質が変性しにくいものである。

【0013】

薬効をもつ蛋白質又は蛋白結合性のある低分子薬剤をヒト血清蛋白質溶液に溶解し結合をはかる場合、両者の結合性の弱い時は、結合強化剤の使用に代えてエステル結合などにより両者を結合させて製造するのが良い。

結合強化剤の場合はイオン結合であるが、エステル結合などの共有結合のほうが結合力が強いものである。

【0014】

緩衝液はpHを一定にするための液のことである。

【0015】

ヒト血清アルブミン、ヒトγグロブリンはヒト血清蛋白質の代表的なものである。

コンドロイチン硫酸とヒアルロン酸はヒト生体中の酸性ムコ多糖体の代表的なものである。

【0016】

本発明における薬効をもつ蛋白質はすべてのペプチド、蛋白結合性のある薬効をもつ低分子薬剤を結合した蛋白質、ワクチンを含むものであり、酸性ムコ多糖体はヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等をはじめとする酸性基をもつムコ多糖体（アミノ糖）のことである。

【0017】

また本発明において、ワクチンはワクチンの作用をもつ高分子物質を薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液に溶解し、次に酸性ムコ多糖体を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなるものであるが、ワクチンの量が多いときはヒト血清蛋白質を用いず、ワクチンと酸性ムコ多糖体の不溶性結合体を作ること、即ちワクチンの作用をもつ高分子物質を酸性ムコ多糖体溶液に混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体が望ましい。

【0018】

コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液とヒトγグロブリン溶液、又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH6～pH8の緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、再度遠沈するとペレット状になる。そしてこのペレット状のものを局所投与するものであるがこのペレット状のものは局所投与のみ可能である。

【0019】

本発明の他の徐放製剤は通常全身投与を目的として皮下あるいは筋肉内に注射するが局所投与も可能である。

【0020】

又本発明のワクチンは、ワクチンの性質、即ち、全身に抗体があがらないと効果がないので本発明のワクチンも基本的に全身投与を目的とするが、鼻、肺及び消化器官については局所投与が可能である。

【0021】

本発明を局所投与することにより、局所における薬剤の持続的高濃度を得ることが出来るものである。

【0022】

又緩衝液はpH6～pH8、即ちpH7前後が適当であるが、特にpH7.2が好適である。

【0023】

コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液と、ヒトγグロブリン溶液又は低分子薬剤を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより生成される不溶性結合体

において、コンドロイチン硫酸ナトリウムに代えてヒアルロン酸ナトリウム又は人体に存在するすべての酸性ムコ多糖体を使用しても良く、又ヒト γ グロブリンに代えてヒト血清アルブミン、ヒトフィブリノーゲン、ヒトヒストン、ヒトプロタミン、ゼラチン、コラーゲンを使用しても良い。

【0024】

さらにコンドロイチン硫酸ナトリウムやヒアルロン酸ナトリウム等の溶液の濃度は0.1%～飽和迄、特に最終濃度が0.1%～2%が適当であり、かつヒト γ グロブリンやヒト血清アルブミン等の溶液の濃度は0.1%～飽和迄、特に最終濃度が0.1%～2%が適当である。

【0025】

蛋白質薬剤としては、各種抗体、EPO、G-CSF、GM-CSF、トロンボポエチン、インターフェロン α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、ウロキナーゼ、TPA、ストレプトキナーゼ、血液凝固因子VIII、IL-2、IL-11、エンブレル、FGF、EGF、HGF、BDNF、NGF、レプチン、NT-3、SOD、カルシトニン、インスリン、ヒト成長ホルモン、他の脳下垂体ペプチドホルモン、バンコマイシン、テイコプラニン、SOD、PTHなどがある。

【0026】

以下、本発明の製剤作製方法について記述する。製剤製造法に関する項目としては、蛋白質、酸性ムコ多糖体、溶液pHの変化の操作、遠沈及び凍結乾燥、凍結乾燥品のヒトへの投与があげられる。

【0027】

蛋白質であるが、薬効をもつ蛋白質で投与量が多い場合はそのまま使用する。投与量の少ないものは、ヒト γ グロブリンやヒト血清アルブミン溶液に溶解、つまり基剤としての蛋白で希釈する形で用いる。蛋白結合性のある低分子薬剤（蛋白質・酸性ムコ多糖体以外的高分子も含む）は、ヒト血清アルブミン溶液などに溶解し使用する。酸性ムコ多糖体であるが、薬効をもつ例外的なものを除き、本徐放製剤においては基剤として用いる。コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸などすでに臨床に使われている酸性ムコ多糖体が望ましい。以上のように蛋白質も酸

性ムコ多糖体もすでにヒトに薬剤として用いられているもの、また生体内物質であるものが好ましいが、この他の蛋白質や酸性ムコ多糖体を利用してもよい。使用する酸性ムコ多糖体や蛋白質の種類によっては生成する不溶性結合体の性状も中性領域での溶解性の速度も異なる。たとえばヒアルロン酸を使用する場合は、ヒトγグロブリンを使用する方が、アルブミンに比べ、中性溶液での不溶性結合体の溶解速度はかなり遅くなる。それゆえ、個々の薬剤に適した蛋白質や酸性ムコ多糖体を使用する方が好ましい。なお、はじめに酸性ムコ多糖体及び蛋白質を溶解する場合、蒸留水、等張食塩水、各種バッファのいずれを用いてもよい。

【0028】

溶液のpHを変える操作は次の通りである。即ち、蛋白質及び酸性ムコ多糖体の混合液を攪拌しながら塩酸（0.1～1規定位が好ましい）を滴下し、pH3程度にする。次第に不溶性の結合体ができる。結合体である沈殿物が十分できたところで遠沈し、沈殿物をグルコース、マンニトールなど適切な安定剤の入ったpH7.2の等張緩衝液に再懸濁し、よく混和する。このものを凍結乾燥し、徐放製剤とする。pHを3程度に下げるためには、塩酸や硫酸などの酸を用いてもバッファなどを用いてもよいが、酸を用いる方がよさそうである。なお、塩酸の濃度は0.1～1規定で十分である。バッファを用いないときは、さらに低い濃度の塩酸を用いる。

本製剤をヒトに投与するときは、蒸留水を加え等張とし、皮下あるいは筋肉内などに投与する。

【0029】

本発明における酸性ムコ多糖体と蛋白質の不溶性結合体の作製に関しては、ほとんど特殊な設備なしできわめて簡便に徐放製剤を作ることができる。また、薬物の封入率もきわめて高く経済的でもある。さらに基剤として使用している酸性ムコ多糖体と蛋白質は、いずれもヒトへの大量使用経験があるものが使えるので安全性にほぼ問題がなく、比較的廉価でもある。本技術の大きな他の特徴は、ほぼすべての蛋白質薬剤に応用できうるとともに、操作中のもっとも過酷な条件であるpHの3への変化では、多くの蛋白質の活性はほとんど影響を受けないことである。このように本製剤はこれまでの注射用徐放製剤と比べ、徐放効果以外に

もはるかに多くの利点をもっている。

【0030】

本製剤の徐放効果はin vitroとin vivoで検討される。in vitroの検討では、蛋白（ヒトγグロブリン、ヒト血清アルブミン、またこれに活性蛋白を含むもののいずれか）と酸性ムコ多糖体（コンドロイチン硫酸ナトリウムかヒアルロン酸ナトリウム）を4：1、3：1、2：1、1：1、1：2の比率で混和し（酸性ムコ多糖体の濃度は1％に固定）、pH3で不溶性結合体を作り、遠沈し、pH7.2のリン酸緩衝液（またはこれに1／10希釈の各種血清を付加する）に再懸濁する。再び遠沈し、上清の蛋白濃度を測定した後、攪拌し、37℃で放置する。この操作を1週間続け、不溶性結合体より1日間に溶出した蛋白濃度を1週間にわたり測定する（コンドロイチン硫酸ナトリウムとヒトγグロブリンの例を図1に示した）。混合比は1：2か1：3がよく1週間にわたり徐放することが認められる。活性蛋白を少量封入した場合は、ELISAなどでその濃度を測定する。

【0031】

in vivoの試験であるが、マウスを用い本徐放製剤の皮下投与で検討できる。上記の方法で作製した蛋白質と酸性ムコ多糖体の結合体、又は少量の蛋白あるいは低分子薬剤を含んだ不溶性結合体の懸濁液をマウスの皮下に注射し、注射後定期的に採血し、薬物の血中濃度を測定する。実施例7（図8参照）に示したように数日間にわたって徐放効果が認められる。

【0032】

本発明を局所投与剤として用いる場合、これまでに述べた方法により得られた薬効成分を含む不溶性結合体の懸濁液の他に、遠沈により得られた同様に薬効成分を含むペレット状のものを用いる。前者の懸濁液の場合は注射で局所病変部に注入し、後者の場合は局所病変部に挿入することにより行われる。また手術時に局所投与する場合は前者の懸濁液と共に後者のペレット状のものが有用である。

【0033】

【実施例】

以下に本発明の実施例について記述する。

【0034】

(実施例1)

100mg/mlコンドロイチン硫酸Aナトリウム (SIGMA社、分子量 $4 \sim 50 \times 10^6$) 30 μ lと30mg/mlヒト γ グロブリン (SIGMA社) 200 μ l及びpH7.2のリン酸緩衝液370 μ lを試験管中で混合し、コンドロイチン硫酸Aナトリウムとヒト γ グロブリンの重量比を1:2、合計量を600 μ lとした。この混合液に0.2規定の塩酸を静かに50 μ l加えてpH3とし、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌の上、3000rpm \times 5分遠心を行った。上清をすべて回収し、その一部を蛋白濃度測定用とした。沈査にpH7.2のリン酸緩衝液を1ml加えボルテックスミキサーを用いてよく攪拌し、3000rpm \times 5分遠心を行い、上清1mlのうち25 μ lをエッペンドルフチューブに採取し蛋白濃度測定用とした。さらにボルテックスミキサーで十分に攪拌し37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートし、24時間ごとに3000rpm \times 5分の遠心後上清より25 μ lを採取することを7日間行った。蛋白濃度はLowry Methodの原理に基づくBioRad社の測定キットを使用し、ヒト γ グロブリン (SIGMA社) を標準品として検量線を求め算出した。ヒト γ グロブリンは2日目まで1日約30%、その後7日目まで1日5%の割合で徐放した (図2)。

【0035】

(実施例2)

20mg/mlヒアルロン酸ナトリウム (生化学工業 (株) より譲与、分子量 23×10^4) 150 μ lと30mg/mlヒト γ グロブリン (SIGMA社) 200 μ l及びpH7.2のリン酸緩衝液250 μ lを試験管中で混合し、ヒアルロン酸ナトリウムとヒト γ グロブリンの重量比を1:2、合計量を600 μ lとした。この混合液に0.2規定の塩酸を静かに50 μ l加えてpH3とし、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌の上、10,000rpm \times 5分遠心を行った。上清をすべて回収し、その一部を蛋白濃度測定用とした。沈査にpH7.2のリン酸緩衝液を1ml加えボルテックスミキサーを用いてよく攪拌し、10,000rpm \times 5分遠心を行い、上清1mlのうち25 μ lをエッペンドルフチューブに採取し蛋白濃度測定用とした。さらにボルテックスミキサーで十分に攪拌し37 $^{\circ}$ Cにてイン

キュベートし、24時間ごとに10,000rpm×5分の遠心後上清より25 μ lを採取することを12日間行った。蛋白濃度はLowry Methodの原理に基づくBioRad社の測定キットを使用し、ヒト γ グロブリン（SIGMA社）を標準品として検量線を求め算出した。ヒト γ グロブリンは1日4%程度の割合で徐放を続けた（図3）。

【0036】

（実施例3）

100mg/mlコンドロイチン硫酸ナトリウム（SIGMA社、分子量4～50 $\times 10^6$ ）30 μ lと30mg/mlヒト血清アルブミン（SIGMA社）200 μ l及びpH7.2のリン酸緩衝液370 μ lを試験管中で混合し、コンドロイチン硫酸ナトリウムとアルブミンの重量比を1:2、合計量を600 μ lとした。この混合液に0.2規定の塩酸を静かに50 μ l加えてpH3とし、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌の上、3000rpm×5分遠心を行った。上清をすべて回収し、その一部を蛋白濃度測定用とした。沈査にpH7.2のリン酸緩衝液を1ml加えボルテックスミキサーを用いてよく攪拌し、3000rpm×5分遠心を行い、上清1mlのうち25 μ lをエッペンドルフチューブに採取し蛋白濃度測定用とした。さらにボルテックスミキサーで十分に攪拌し37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートし、24時間ごとに3000rpm×5分の遠心後上清より25 μ lを採取することを7日間繰り返した。蛋白濃度はLowry Methodの原理に基づくBioRad社の測定キットを使用し、ヒト血清アルブミン（SIGMA社）を標準品として検量線を求め算出した。アルブミンは1日5%程度の割合で徐放した（図4）。

【0037】

（実施例4）

20mg/mlヒアルロン酸ナトリウム（生化学工業（株）より譲与、分子量23 $\times 10^4$ ）150 μ lと30mg/mlヒト血清アルブミン（SIGMA社）200 μ l及びpH7.2のリン酸緩衝液250 μ lを試験管中で混合し、ヒアルロン酸ナトリウムとアルブミンの重量比を1:2、合計量を600 μ lとした。この混合液に0.2規定の塩酸を静かに50 μ l加えてpH3とし、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌の上、10,000rpm×5分遠心を行った。上清をすべて

回収し、その一部を蛋白濃度測定用とした。沈査に pH 7.2 のリン酸緩衝液を 1 ml 加えボルテックスミキサーを用いてよく攪拌し、10,000 rpm×5 分遠心を行い、上清 1 ml のうち 25 μ l をエッペンドルフチューブに採取し蛋白濃度測定用とした。さらにボルテックスミキサーで十分に攪拌し 37℃ にてインキュベートし、24 時間ごとに 10,000 rpm×5 分の遠心後上清より 25 μ l を採取することを数日繰り返した。蛋白濃度は Lowry Method の原理に基づく BioRad 社の測定キットを使用し、ヒト血清アルブミン (SIGMA 社) を標準品として検量線を求め算出した (図 5)。

【0038】

(実施例 5)

レシチン化した SOD (PC-SOD)、PC-SOD+コンドロイチン硫酸ナトリウム+ヒト γ グロブリンを酸性溶液中で不溶性結合体を作り、SOD として等量マウス皮下に注射し、血中 SOD の量をアイソトープ法を用いて測定した。SOD はいずれもトリチウムラベルしてある。本発明の徐放製剤を用いると初期血中高濃度が抑えられ血中濃度が長時間維持されることが分かる (図 6)。

【0039】

(実施例 6)

5 mg/ml インドメタシン (和光純薬工業 (株)) エタノール溶液 60 μ l と 100 μ Ci/ml [14 C] インドメタシン (第一化学薬品 (株)) エタノール溶液 5 μ l を試験管中で混合し、30 mg/ml ヒト血清アルブミン (SIGMA 社) 100 μ l 及び 30 mg/ml ヒト γ グロブリン (SIGMA 社) 200 μ l を加えて混合し、さらに 100 mg/ml コンドロイチン硫酸ナトリウム 30 μ l と pH 7.2 のリン酸緩衝液 805 μ l を加えて混合し、コンドロイチン硫酸ナトリウムと総蛋白の重量比を約 1:3、合計量を 1200 μ l とした。この混合液に 0.2 規定の塩酸を静かに 100 μ l 加えて pH 3 とし、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌の上、3000 rpm×5 分遠心を行い、上清をすべて回収した。沈査に pH 約 7 のリン酸緩衝液を 1 ml 加えボルテックスミキサーを用いてよく攪拌し、3000 rpm×5 分遠心を行い、上清を別のチューブに回収した。さらにリン酸緩衝液を 1 ml 加えてボルテックスミキサーで十分に攪拌し 37℃ にてインキュベートし、2

4時間ごとに3000rpm×5分の遠心後上清を全量回収することを7日間繰り返した。回収した上清1mlのうち100 μ lをシンチレーションバイアルに採取し、シンチレーションカクテル (Packard社) 5mlを加え、シンチレーションカウンタにて上清に放出したインドメタシンの濃度を ^{14}C の放射活性として測定し、1サンプル分の [^{14}C] インドメタシン全量の放射活性に対する放出割合として算出した (図7)。

【0040】

(実施例7)

20mg/mlヒト γ グロブリン (SIGMA社) 150 μ lと10 μCi [125I] ヒトIgG (γ グロブリンの主成分、ICN Biochemicals社) を混合し、さらに10mg/mlコンドロイチン硫酸ナトリウム100 μ lとpH7.2のリン緩衝液100 μ lを加えて混合し、コンドロイチン硫酸ナトリウムと総タンパクの重量比を約1:3とする。この混合液に0.2規定の塩酸を静かに100 μ lを加えてpH3とし、ボルテックスミキサーを用いてよく攪拌する。これを1500rpm×10分、4℃で遠沈し、上清をすべて回収し、その一部をグロブリン濃度測定用とする。沈査にpH7.2のリン酸緩衝液を450 μ lを加え、攪拌し、これを3週齢のマウス (C3H) の皮下に投与し、投与後4時間、1日～5日目に眼底より50 μ lずつ採決を行い、マウス血液中のヒト γ グロブリンの濃度を125Iの放射活性として測定する (図8のChor-S)。なお、コントロール (図8のControl) としては、計算上上記と同量になるように125IラベルヒトIgGとヒト γ グロブリンのみを投与した。

【図面の簡単な説明】

【図1】

コンドロイチン硫酸ナトリウムとヒト γ グロブリンの混和比率を変化させたときのヒト γ グロブリンの徐放について示す図である。

【図2】

コンドロイチン硫酸ナトリウムとヒト γ グロブリンを1:2の比率で不溶性結合体を作った場合の放出を示す図である。

【図3】

ヒアルロン酸ナトリウム (MW 2.3 万) とヒト γ グロブリンを 1 : 2 の比率で不溶性結合体を作った場合の放出を示す図である。

【図 4】

コンドロイチン硫酸ナトリウムとヒト血清アルブミンを 1 : 2 の比率で不溶性結合体を作った場合の放出を示す図である。

【図 5】

ヒアルロン酸ナトリウムとヒト血清アルブミンを 1 : 2 の比率で混和したときのアルブミンの放出を示す図である。

【図 6】

PC-SOD を投与したときのマウス体内での放出を示す図である。

【図 7】

インドメタシンの徐放を示す図である。

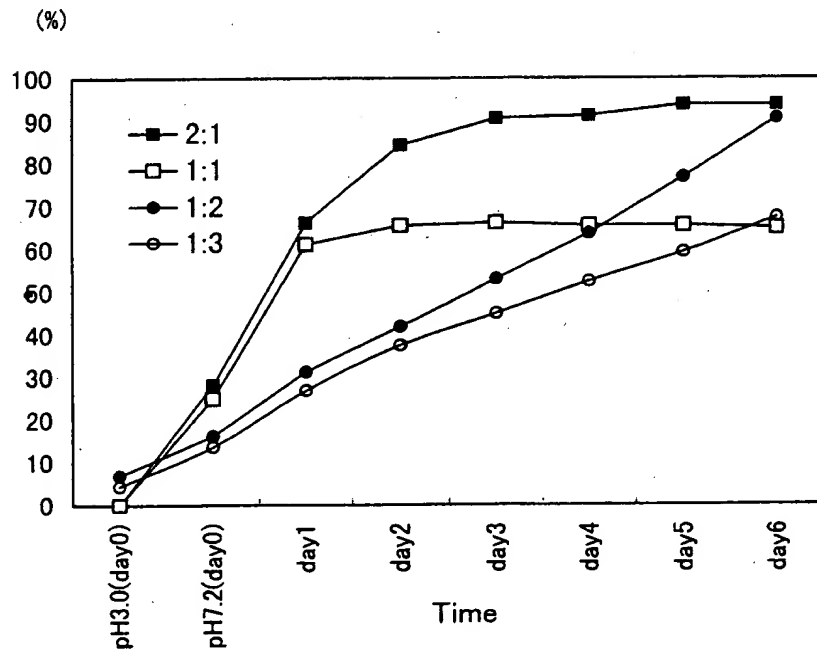
【図 8】

コンドロイチン硫酸ナトリウムとヒト γ グロブリン不溶性結合体 (Ch o - S) と γ グロブリンのみ (C o n t r o l) をマウスに注射した時の血中 γ グロブリン濃度を示す図である。

【書類名】 図面

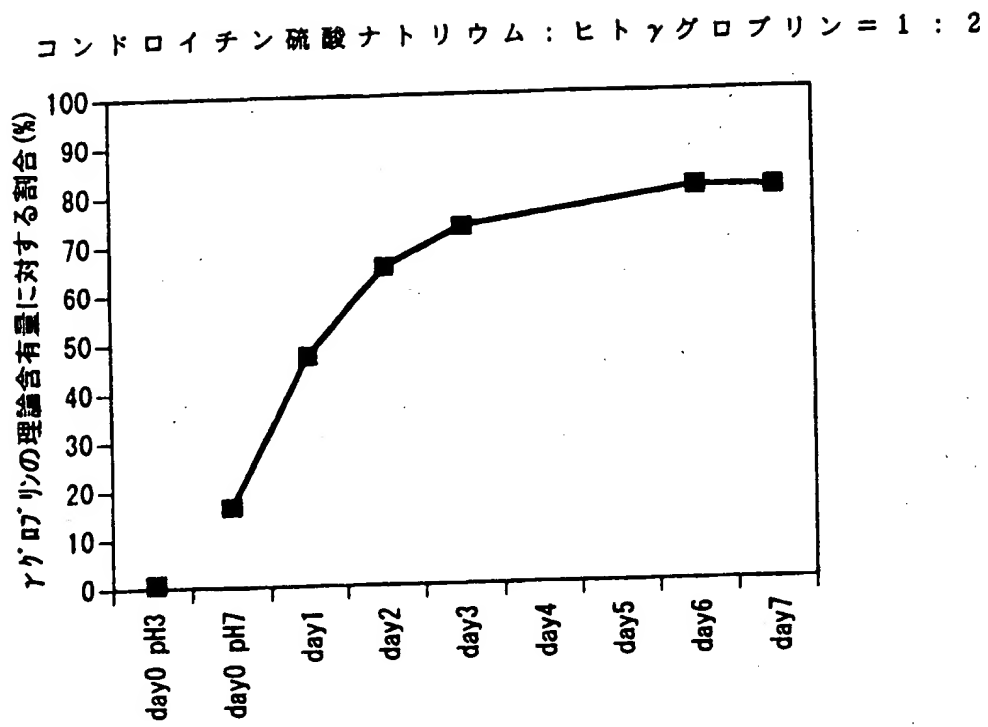
【図 1】

コンドロイチン硫酸ナトリウムとヒトγグロブリンの混和比率を変化させたときのヒトγグロブリンの徐放について



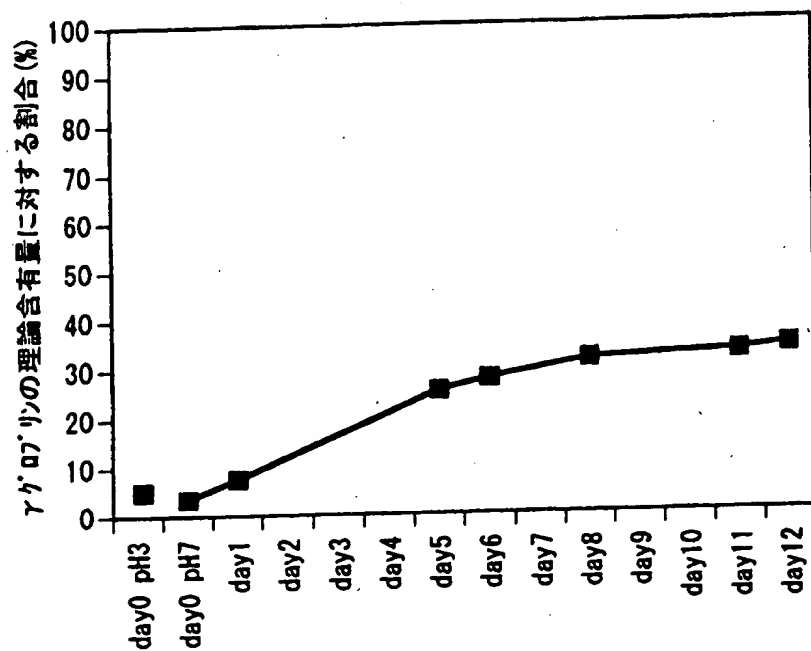
コンドロイチン硫酸とγグロブリンを2:1から1:3に混合し不溶性結合体を作り、37℃で各24時間中に上清に溶出されたGlobの量(初期量の%で表す)

【図 2】



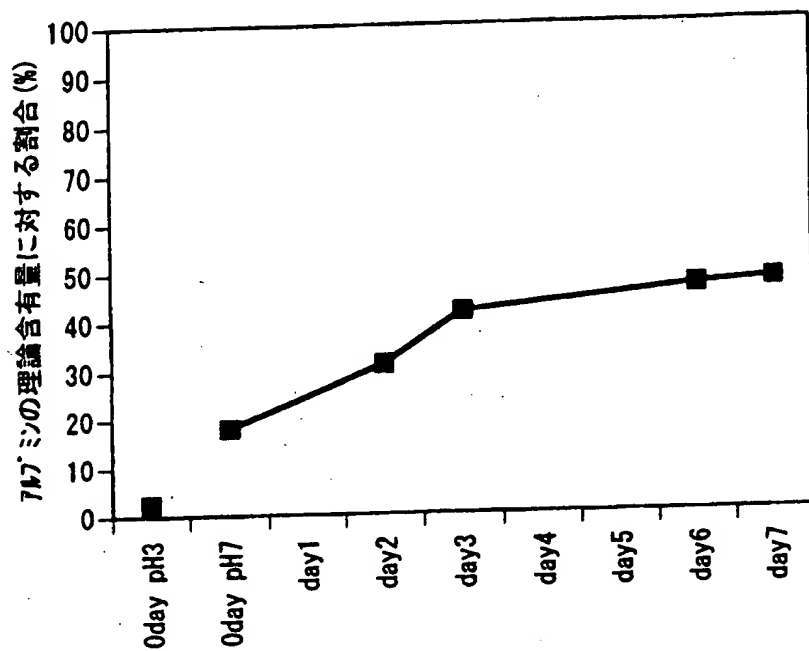
【図 3】

ヒアルロン酸ナトリウム(MW 23万):ヒトγグロブリン=1:2



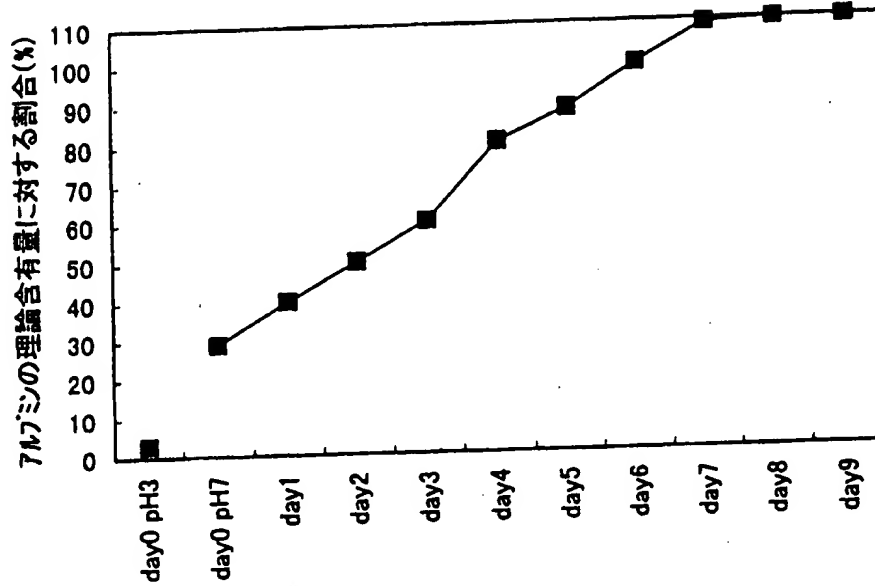
【図 4】

コンドロイチン硫酸ナトリウム：ヒト血清アルブミン = 1 : 2

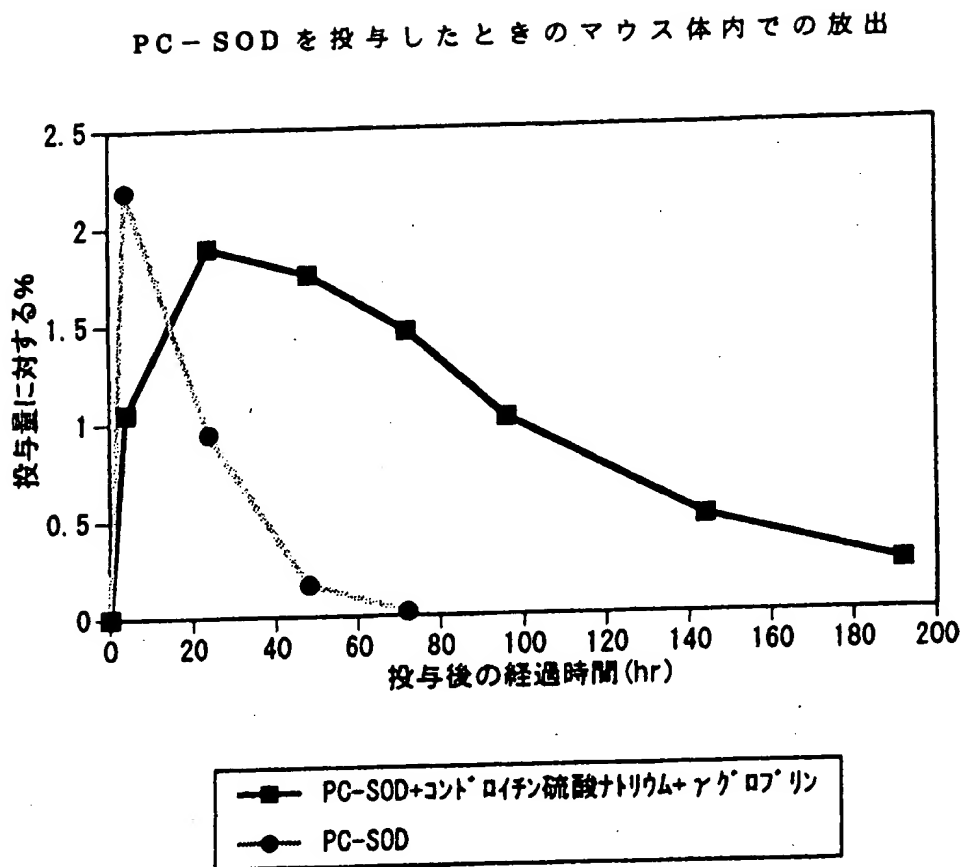


【図 5】

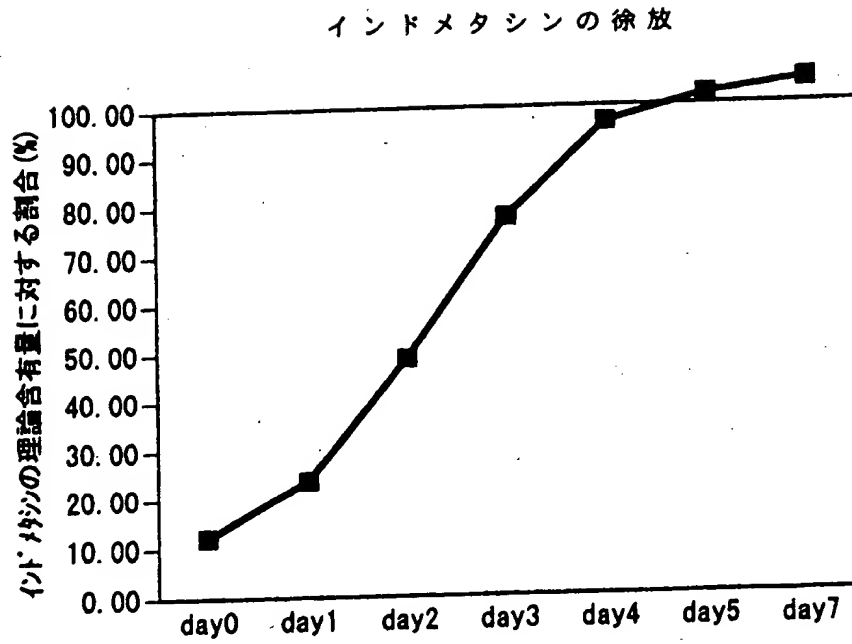
ヒアルロン酸ナトリウム：ヒト血清アルブミン 1：2 の比率で
混和したときのアルブミン release



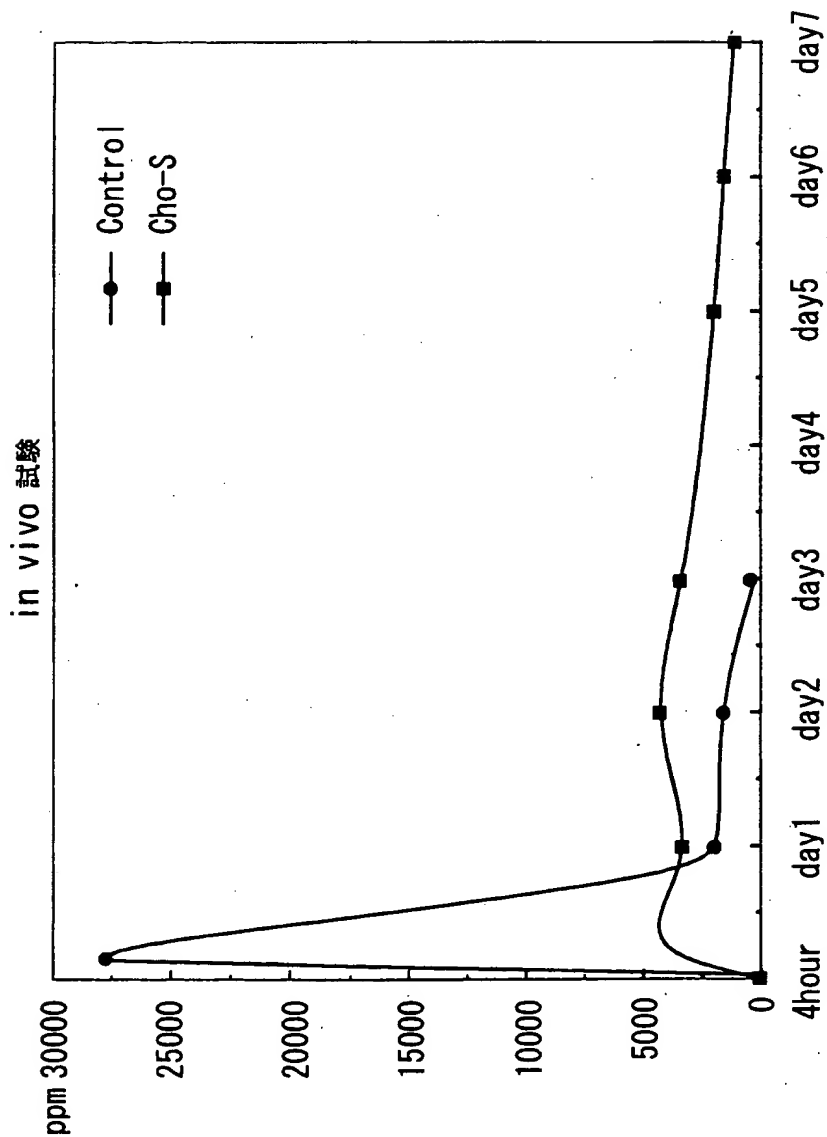
【図 6】



【図 7】



【図 8】



いずれも¹²⁵I IgGラベルしたヒトγグロブリンのみ (Control) とコンドロイチン硫酸を用いたγグロブリンの不溶性結合体 (Cho-S) をマウス皮下に注射し、経時的にアイソトープの量からγグロブリンの血中濃度を測定した。500カウント以下はバックグラウンドとした。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 製剤作製方法がきわめて簡単であり、ほとんどすべての蛋白医薬品に応用できるとともに、蛋白結合性のある多くの低分子医薬品についても利用可能で優れた徐放効果が得られる蛋白質と多糖体不溶性結合体からなる徐放製剤、ワクチン、及び徐放製剤の製造法を提供すること。

【解決手段】 薬効をもつ蛋白質溶液と酸性ムコ多糖体溶液を混和することにより製造される不溶性結合体からなる徐放製剤であること、ワクチンの作用をもつ高分子物質を薬効をもたないヒト血清蛋白質溶液に溶解し、次に酸性ムコ多糖体を混和し、溶液を酸性とすることにより生成される不溶性結合体からなるワクチンであること、コンドロイチン硫酸ナトリウム溶液とヒトγグロブリン溶液、又は低分子医薬品を含むグロブリン溶液を混和し、酸性にすることにより不溶性結合体を生成し、遠沈し、上清を除去し、pH 6～pH 8の緩衝液に当該不溶性結合体を小さな粒子となるよう再懸濁させ、凍結乾燥することにより製造される徐放製剤の製造法であること。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-203850
受付番号	50000845114
書類名	特許願
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成12年 8月15日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 7月 5日
【特許出願人】	
【識別番号】	391043055
【住所又は居所】	東京都千代田区永田町1-11-28
【氏名又は名称】	株式会社エルティーティー研究所
【代理人】	申請人
【識別番号】	100096758
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋3丁目6番10号 マスキチビル3階
【氏名又は名称】	高橋 剛
【選任した代理人】	
【識別番号】	100114845
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋三丁目6-10 高橋国際特許事務所
【氏名又は名称】	高橋 雅和

【書類名】 手続補正書

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-203850

【補正をする者】

【識別番号】 391043055

【氏名又は名称】 株式会社エルティーティー研究所

【代理人】

【識別番号】 100096758

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 剛

【代理人】

【識別番号】 100114845

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 雅和

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区梅丘 1 - 1 - 1 1

【氏名】 水島 裕

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区南生田 5 - 8 - 2

【氏名】 五十嵐 理慧

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区太尾町 1 5 6 東芝太尾アパート 1
- 1 1 6

【氏名】 北川 晶

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区長沢4-3-2

【氏名】 高木 幸江

【その他】 本願発明者のうち「水島 裕」の住所を正しくは「東京都世田谷区梅丘1-1-11」とするところ、タイプミスで「東京都世田谷区梅丘1-11-11」として出願してしまいました。そこでここに住所を訂正致しますので宜しく御審査のほどお願い致します。

【ブルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-203850
受付番号	50000923157
書類名	手続補正書
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成12年 8月15日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 7月21日
【補正をする者】	
【識別番号】	391043055
【住所又は居所】	東京都千代田区永田町1-11-28
【氏名又は名称】	株式会社エルティーティー研究所
【代理人】	申請人
【識別番号】	100096758
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋3丁目6番10号 マスキチビル3階
【氏名又は名称】	高橋 剛
【代理人】	
【識別番号】	100114845
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋三丁目6-10 高橋国際特許事務所
【氏名又は名称】	高橋 雅和

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [391043055]

1. 変更年月日 1997年12月 5日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都千代田区永田町1-11-28
氏 名 株式会社エルティーティー研究所
2. 変更年月日 2001年12月13日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区愛宕二丁目5番1号
氏 名 株式会社エルティーティー研究所